

Guide d'interprétation

3M

Petrifilm™

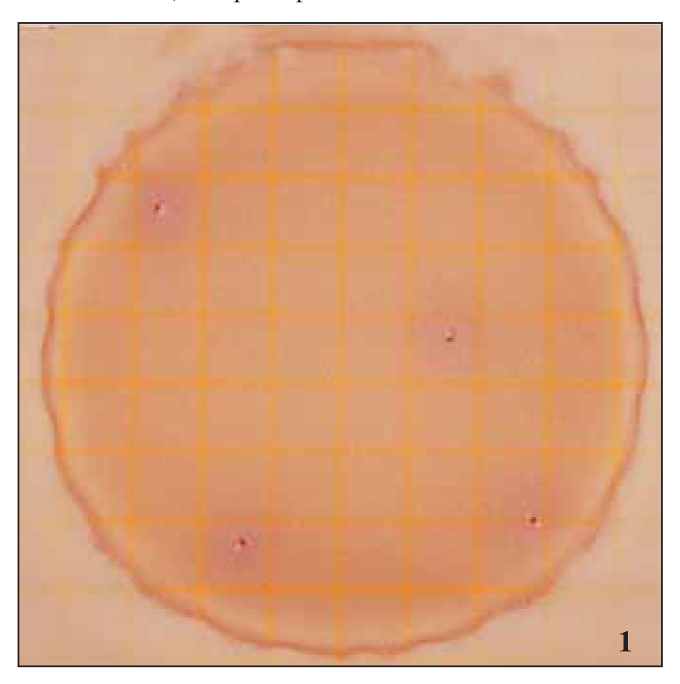
Test Haute Sensibilité pour la Numération des Coliformes

Ce document est destiné à vous apporter une aide pour l'interprétation des résultats obtenus à partir du test 3M Petrifilm™ Haute Sensibilité pour la numération des Coliformes (HSCC). Pour plus d'information, renseignez-vous auprès de votre contact officiel 3M Microbiologie le plus proche.

Le test 3M Petrifilm HSCC est un milieu de culture prêt à l'emploi qui contient un milieu sélectif de type VRBL (composé de sels biliaires, de cristal violet et de rouge neutre), un agent gélifiant soluble dans l'eau froide et un indicateur au tétrazolium facilitant la lecture. Le film supérieur retient le gaz produit par les colonies fermentant le lactose. La durée et la température d'incubation, de même que l'interprétation varient selon les méthodes employées.

- L'**ISO** définit les coliformes par leur capacité à se développer sur un milieu spécifique. La **méthode ISO 4832,** dénombrement des coliformes par comptage des colonies, définit les coliformes par la taille de la colonie et la production d'acide sur milieu VRBL (Violet Red Bile Lactose). Sur les tests Petrifilm HSCC, les colonies caractéristiques de ces coliformes sont rouges avec ou sans bulles de gaz autour de la colonie (à une distance au maximum équivalente au diamètre d'une colonie). La **méthode ISO 4831** décrit une numération des coliformes par la technique du Nombre le Plus Probable (NPP) et définit les coliformes par leur capacité à se développer et à produire du gaz par fermentation du lactose dans un bouillon sélectif. Sur les tests Petrifilm HSCC, les colonies caractéristiques de ces coliformes sont alors rouges avec une ou plusieurs bulles de gaz autour de la colonie (à une distance au maximum équivalente au diamètre d'une colonie).

- L'**AOAC INTERNATIONAL** et la « Food and Drug Administration » « Bacteriological Analytical Manual » (BAM) définissent les coliformes comme des bâtonnets Gram négatif produisant de l'acide et du gaz par fermentation métabolique du lactose. Les colonies de coliformes se développant sur les tests Petrifilm HSCC produisent de l'acide qui assombrit la couleur du gel ; la présence d'une ou plusieurs bulles de gaz autour d'une colonie (à une distance au maximum équivalente au diamètre d'une colonie) indique la présence de coliformes.



Nombre de colonies gazogènes : 4

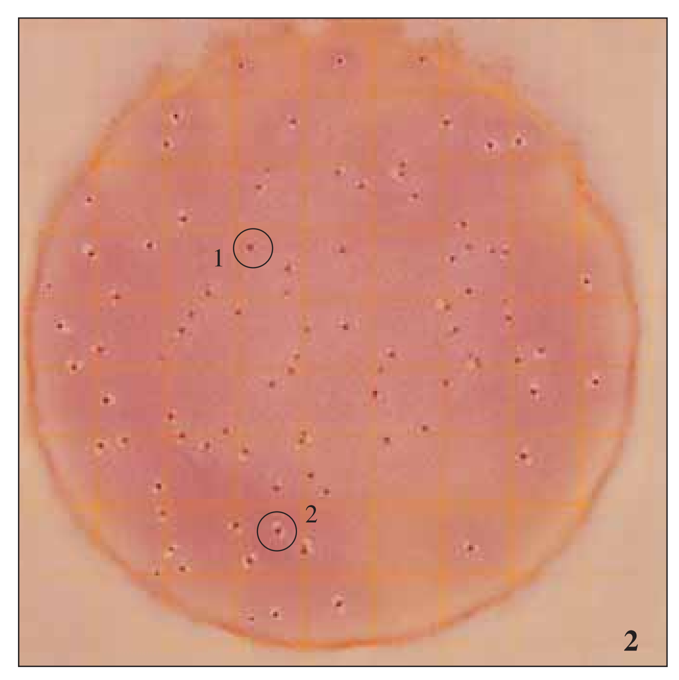
Le test Petrifilm HSCC permet la détection des coliformes totaux et des coliformes thermotolérants (fécaux).

Le test Petrifilm HSCC est particulièrement recommandé pour le dénombrement des coliformes en faible nombre dans les aliments.

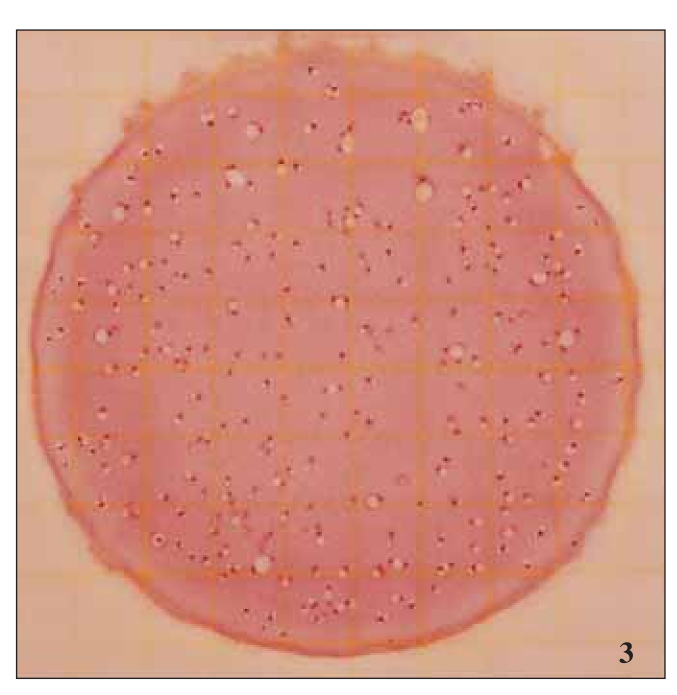
L'AFNOR a validé l'emploi du test Petrifilm HSCC dans certaines conditions. Voir la Fiche d'Utilisation incluse dans ce Guide d'Interprétation.

Test 3M™ Petrifilm™ Haute Sensibilité pour la Numération des Coliformes

A noter le changement de couleur du gel des tests Petrifilm HSCC représentés sur les photos 1 à 5.
La production d'acide augmente proportionnellement au nombre de coliformes présents, la couleur du gel vire alors du rose-orangé clair à un rose soutenu.



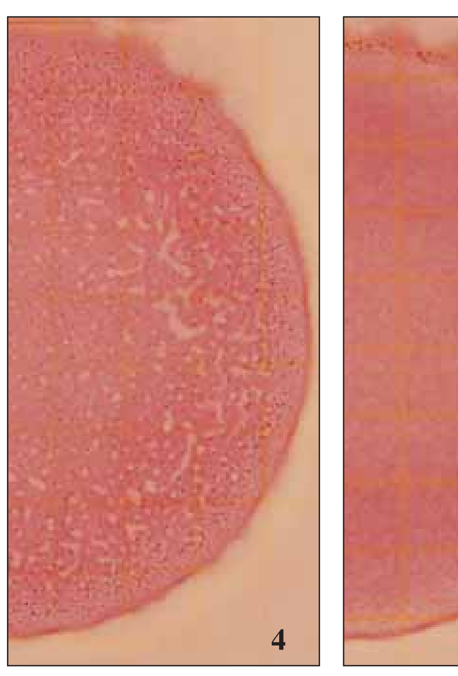
Nombre de colonies gazogènes : 82
Nombre de colonies non gazogènes : 8
Nombre total de colonies : 90
La forme des bulles peut varier : voir cercles 1 et 2.
Parfois, la quantité de gaz produite par la colonie fait éclater celle-ci.

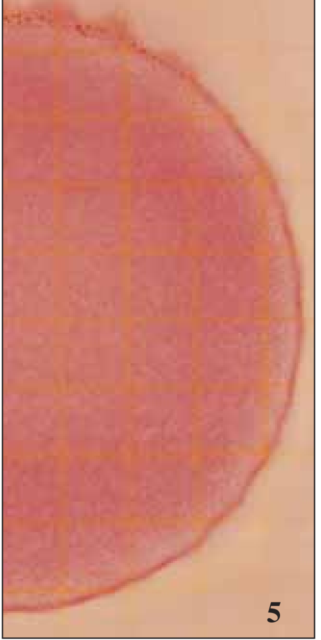


Nombre estimé de colonies : 320

La zone de croissance circulaire du test Petrifilm HSCC est de 60 cm^2 environ. Des estimations sont possibles sur des tests Petrifilm HSCC contenant plus de 150 colonies en comptant le nombre de colonies dans un ou plusieurs carrés représentatifs et en déterminant le nombre moyen par carré. Multipliez ce nombre moyen par 60 pour déterminer le nombre estimé par test Petrifilm HSCC.

Pour obtenir un dénombrement précis, procéder à d'autres dilutions.

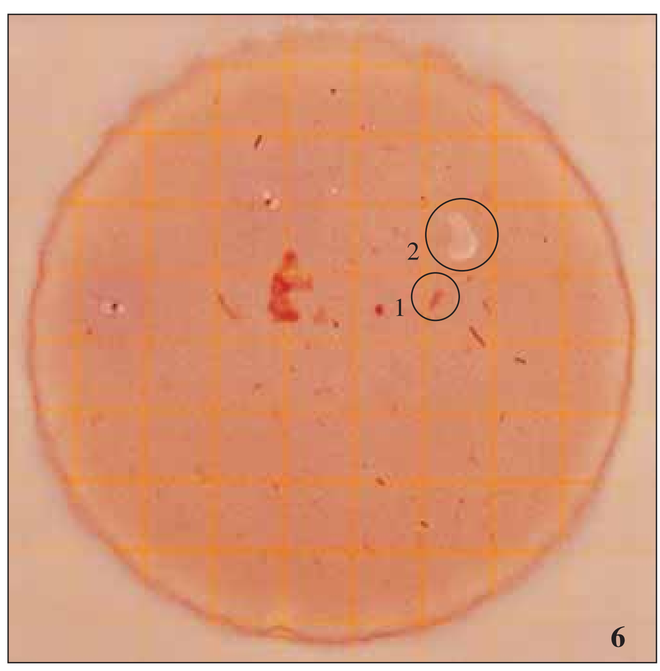




Tests Petrifilm HSCC incomptables

Les tests Petrifilm HSCC incomptables présentent une ou plusieurs de ces caractéristiques : nombreuses petites colonies, nombreuses bulles de gaz, gel de couleur rose plus soutenu.

Pour obtenir un dénombrement précis, procéder à d'autres dilutions.



Nombre de colonies gazogènes : 2

Les débris d'aliments sont souvent de forme irrégulière et ne sont pas associés à des bulles de gaz : voir cercle 1.

La présence d'air dans l'échantillon ou une inoculation inadéquate du test Petrifilm HSCC peut induire la présence de bulles artefact dans le gel. Ces bulles sont de taille irrégulière et non associées à une colonie rouge : voir cercle 2.

3M™ Petrifilm™

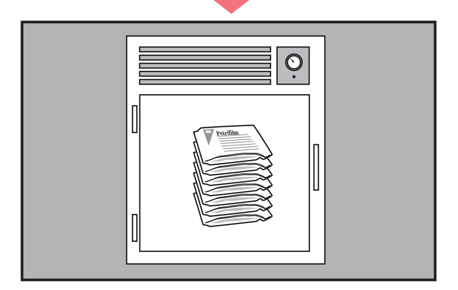
Haute Sensibilité pour la Numération des Coliformes

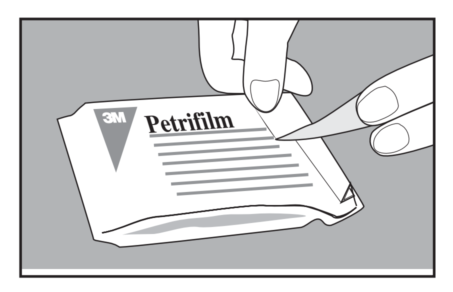
Pour des informations détaillées concernant les Mises en garde, Responsabilité de l'utilisateur, Garantie limitée, Limitation de responsabilité de 3M, Stockage et Destruction, Mode d'emploi, se reporter à la Notice d'utilisation.

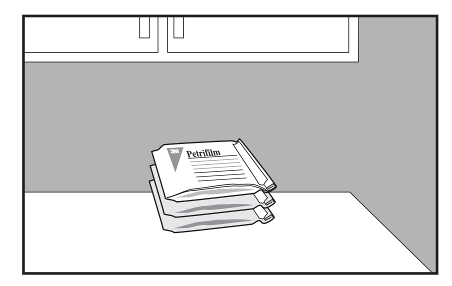

Fiche d'utilisation



Stockage





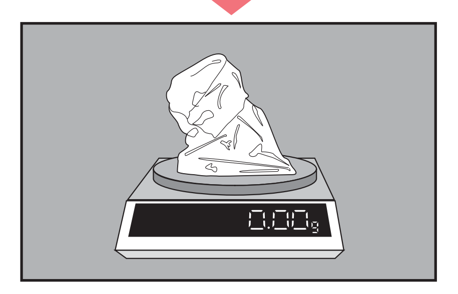


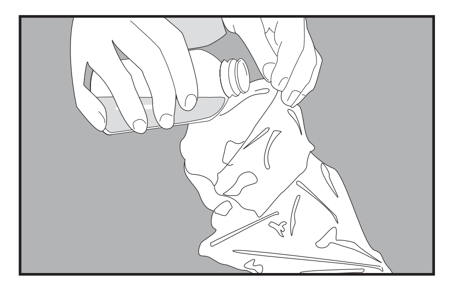
1 Stocker réfrigérées ou congelées les poches non ouvertes de tests Petrifilm HSCC à une température ≤ 8°C (≤ 46°F). Utiliser les tests Petrifilm HSCC avant la date d'expiration indiquée sur la poche. Dans les locaux où règne une forte humidité il est préférable de laisser les poches atteindre la température ambiante avant ouverture afin d'éviter l'apparition de condensation.

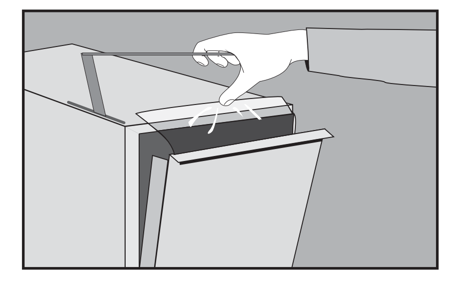
2 Pour refermer les poches, replier l'extrémité et fermer à l'aide d'un ruban adhésif ou d'une pince.

3 Garder les poches entamées à une température ≤25°C (≤77°F) et une Humidité Relative ≤50%. **Ne pas les placer au réfrigérateur.** Utiliser les tests Petrifilm HSCC dans le mois qui suit l'ouverture de la poche.

Préparation







4 Peser ou pipeter le produit dans un récipient stérile (sac stomacher, bouteille, sac Whirl-Pack® ou autre).

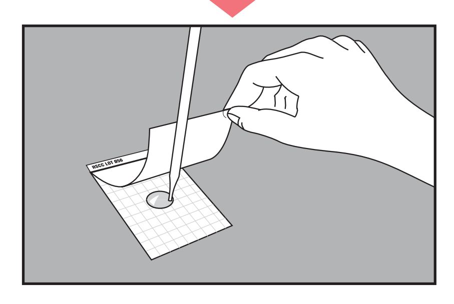
5 Ajouter les quantités nécessaires de l'un des diluants suivants stérilisé : peptone-sel ou « maximum recovery diluent » (méthode ISO 6887), tampon phosphate Butterfield (tampon phosphate IDF, KH_2PO_4 à 0,0425g/l, ajuster le pH à 7,2), eau peptonée à 0,1%, eau peptonée tamponnée (méthode ISO 6579), solution saline (0,85 - 0,90%), solution de letheen sans bisulphite ou eau distillée.

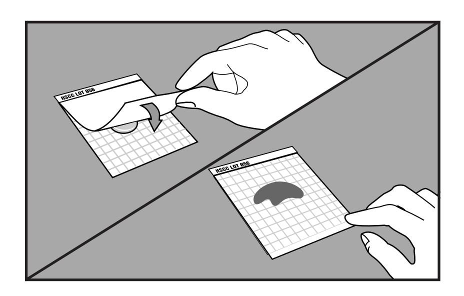
Ne pas utiliser de tampons contenant du citrate, du bisulfite ou du thiosulfate, ils peuvent inhiber la croissance des bactéries.

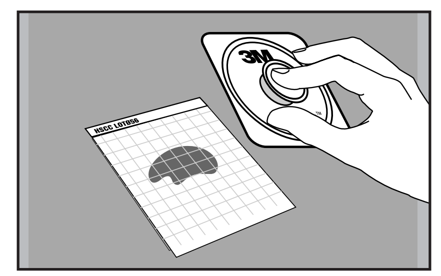
6 Broyer ou homogénéiser l'échantillon en utilisant la procédure habituelle.

Ajuster le pH de l'échantillon entre 6,5 et 7,5 :
- pour les produits acides, utiliser NaOH 1N,
- pour les produits alcalins, utiliser HCl 1N.

Ensemencement







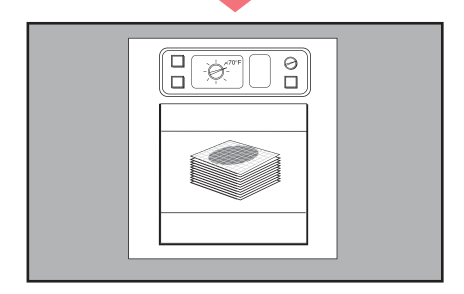
7 Placer le test Petrifilm HSCC sur une **surface plane.** Soulever le film supérieur. Avec une pipette tenue **perpendiculairement** au test Petrifilm HSCC, déposer **5 ml** de l'échantillon dilué au centre du film inférieur.

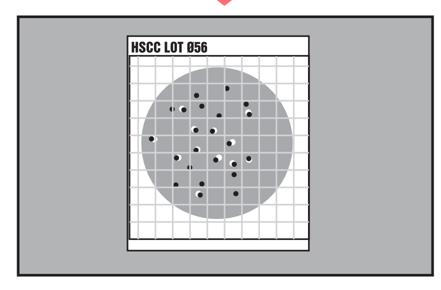
8 **Recouvrir délicatement** avec le film supérieur de manière à éviter l'introduction de bulles d'air. Ne pas laisser le film supérieur retomber brutalement.

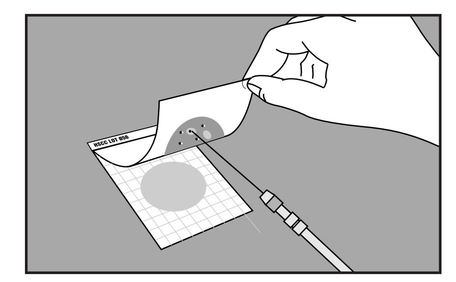
9 Placer le **diffuseur Haute Sensibilité** au centre du film supérieur, au niveau de l'inoculum. Etaler l'échantillon en exerçant une **légère pression** sur le diffuseur. Ne pas tourner ou faire glisser le diffuseur. Retirer le diffuseur. Attendre **2 à 5 minutes** pour permettre au gel de se solidifier.

Incubation

Interprétation







10 Incuber les tests Petrifilm HSCC à l'horizontale, le film supérieur vers le haut, sans empiler plus de 10 unités. La température d'incubation varie selon les méthodes*.

Méthode habituellement pratiquée (Europe) :

- Méthode validée AFNOR 3M 01/7-03/99 : incuber 24h ± 2h à 30°C ± 1° ou 35°C ± 1°C ou 37°C ± 1°C, pour les coliformes totaux.
- Incuber 24h ± 2h à 44°C ± 1°C, pour les coliformes thermotolérants. Dans ce cas, l'étuve doit être humidifiée pour minimiser la déshydratation.

Méthode habituellement pratiquée (Etats-Unis)

- Incuber 24h ± 2h à 32 ± 1°C (produits laitiers)
- Incuber 24h ± 2h à 35 ± 1°C (tous produits, sauf produits laitiers)

* Voir Notice d'utilisation

11 Lire les tests Petrifilm HSCC à l'œil nu ou à l'aide d'un système permettant une amplification visuelle ou lumineuse. Se référer au Guide d'Interprétation pour la lecture des résultats.

12 Pour isoler une colonie en vue d'une identification plus poussée, soulever le film supérieur et prélever la colonie à l'aide d'une anse stérile.

Dilutions

Dilutions minimales recommandées

- **Pour l'analyse des yaourts, du beurre et des produits laitiers déshydratés, une dilution au 1:10 est recommandée. Ceci permet d'obtenir un seuil de sensibilité de 2 coliformes/g.**
- **Pour l'analyse de la crème fraiche, des crèmes glacées, des crèmes fermentées, du lait chocolaté, une dilution au 1:5 est recommandée. Ceci permet d'obtenir un seuil de sensibilité de 1 coliforme/g.**
- **Pour l'analyse du lait cru, des laits pasteurisés entiers et écrémés, aucune dilution n'est nécessaire.**

Référence du document

Date	*Version*
Mai 1999	1.0



Département Microbiologie
Laboratoires 3M Santé

Boulevard de l'Oise
95029 Cergy Pontoise Cedex
France
Tel. : 01 30 31 85 77
Fax: 01 30 31 85 78
www.3M.com/microbiology

3M Europe
Laboratoires 3M Santé

Boulevard de l'Oise
95029 Cergy Pontoise Cedex
France
Tel : +33 (0) 1 30 31 85 71
Fax: +33 (0) 1 30 31 85 78
www.3M.com/microbiology

